

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 38/19, A61P 3/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/66149 (43) Date de publication internationale: 9 novembre 2000 (09.11.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01171 (22) Date de dépôt international: 28 avril 2000 (28.04.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/05450 29 avril 1999 (29.04.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3 Rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GERHARDT, Cinderella [NL/FR]; 5, Cité Bauer, F-75014 Paris (FR). ROMERO-ROMERO, Ignacio Andrés [ES/GB]; 43A Oxford Road, Londres N1 1EA (GB). STROSBERG, A., Donny [FR/FR]; 66 Rue de Javel, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).	(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: MEDICINES USEFUL FOR TREATING DISORDERS OF REGULATION OF BODY FATNESS AND DISEASES RELATED TO DISORDERS OF LEPTIN PRODUCTION (54) Titre: MÉDICAMENTS UTILES POUR LE TRAITEMENT DES TROUBLES DE LA RÉGULATION DE LA MASSE ADIPEUSE ET DES MALADIES ASSOCIÉES AUX TROUBLES DE LA PRODUCTION DE LEPTINE (57) Abstract <p>The invention concerns the use of agonists and antagonists of chemokine receptors for preparing medicines useful for treating disorders of regulation of body fatness, in particular obesity, cachexia, anorexia, diabetes and hyperlipidemia, and for treating diseases related to disorders of leptin production.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne l'utilisation des agonistes et des antagonistes des récepteurs de chimiokines pour la préparation de médicaments utiles dans le traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse, notamment de l'obésité, de la cachexie, de l'anorexie, du diabète et de l'hyperlipidémie, et dans le traitement des maladies associées aux troubles de la production de leptine.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bréasil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CJ	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**MEDICAMENTS UTILES POUR LE TRAITEMENT
DES TROUBLES DE LA REGULATION DE LA
MASSE ADIPEUSE ET DES MALADIES ASSOCIEES
AUX TROUBLES DE LA PRODUCTION DE LEPTINE**

5

La présente invention se rapporte à des médicaments destinés au traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse et des maladies associées aux troubles de la production de leptine.

Les adipocytes sont considérés comme jouant un rôle clé dans le
10 contrôle de la masse corporelle, aussi bien dans les cas normaux de ce contrôle du poids que dans les cas pathologiques, où existe un dérèglement de ce contrôle, notamment en cas d'augmentation de la masse grasseuse (obésité) ou en cas de diminution de cette masse grasseuse (cachexie). Cependant peu d'informations existent sur les facteurs qui régulent la biologie des adipocytes, en particulier sur ceux
15 qui interviennent dans la formation de la graisse.

L'obésité est une maladie chronique dont les conséquences sur la santé sont importantes et dont la fréquence à travers le monde est en pleine expansion (Hill J.O. *et al.* (1998), *Science*, 280, 1371-1374). Parce que l'obésité résulte d'un déséquilibre de la balance énergétique et que les adipocytes sont considérés comme le
20 site principal de stockage et de mobilisation de l'énergie, de nombreuses études ont été réalisées pour comprendre la biologie des adipocytes.

Les états cachectiques, caractérisés par la perte du tissu adipeux et de la masse musculaire squelettique, sont observés en cas d'infections, de SIDA et chez la moitié des patients atteints d'un cancer. Ces modifications ne peuvent pas
25 s'expliquer seulement par l'anorexie observée dans ces maladies puisqu'un complément nutritionnel seul, ne suffit pas à inverser ce processus de perte de poids. Une augmentation de la consommation d'énergie au repos pourrait contribuer à cette perte de poids chez certains patients cancéreux et pourrait expliquer l'augmentation de l'oxydation de la graisse. Il a été suggéré, que des facteurs circulants comme les
30 cytokines, le TNF- α (facteur de nécrose tumorale α), les interleukines-1 et -6 et l'interféron γ pourraient être des médiateurs intervenant dans la cachexie ; toutefois, à ce jour aucune étude en laboratoire ou en clinique ne permet de prouver que ces différents facteurs pourraient jouer un rôle dans la cachexie chez l'homme et que l'action des cytokines à elle seule pourrait expliquer le mécanisme complexe de perte
35 de poids, due à la cachexie observée dans les cancers et le SIDA (Argiles J. M *et al.*, (1997), *Faseb*, 11, 743-751 ; Tisdale M. J., (1997), *J. Natl ; Cancer Inst*, 89, 1763-1773).

De même aucun lien n'a été mis en évidence entre les taux plasmatiques de leptine et les états cachectiques alors que cette hormone impliquée dans l'obésité est sécrétée par les adipocytes (Leroy P. *et al.* (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 2365-2369)

5 La différenciation adipocytaire (ou adipogénèse) fait intervenir plusieurs facteurs transcriptionnels, en particulier des facteurs de la famille des C/EBP (*CCAAT/enhancer binding proteins*) et des PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*), ainsi que des facteurs de la famille des protéines à motif HLH (hélice-boucle-hélice).

10 La régulation de l'activité de ces facteurs transcriptionnels par certains agents, conduit à la modulation de la différenciation adipocytaire. Ainsi certains agents favorisent la différenciation adipocytaire (action adipogénique), d'autres inhibent la différenciation adipocytaire (action anti-adipogénique), d'autres, enfin, peuvent avoir les deux types d'action.

15 Parmi les agents anti-adipogéniques, on trouve les deux formes d'une cytokine, le TNF- α (facteur de nécrose tumorale α) qui inhibe l'expression de C/EBP α et de PPAR γ 2 (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ 2*) et le TNF- β (facteur de nécrose tumorale β) qui prévient la différenciation adipocytaire indépendamment de son effet mitogénique (Loftus T.M. *et al.*, *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1997), 7, 603-608).

20 Des études réalisées sur les adipocytes ont montré également que les adipocytes sécrètent le TNF- α et une autre cytokine multifonctionnelle, l'IL-6, (interleukine-6) qui sembleraient ainsi jouer un rôle dans la régulation de l'entrée des acides gras dans le tissu adipeux et dans leur métabolisme (Fried S.K. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1998), 83, 847-850).

25 Cependant, à l'exclusion du TNF et de l'IL-6, qui sont des cytokinés à action très générale, aucune étude, à ce jour, n'a montré que d'autres médiateurs de l'inflammation intervenaient dans la différenciation adipocytaire, ou étaient sécrétés par les adipocytes.

30 La synthèse des cytokines se fait *de novo* lors d'une activation cellulaire et elles agissent en se fixant sur des récepteurs spécifiques, possédant une seule région transmembranaire et liés à des kinases intracellulaires. Leur action s'exerce le plus souvent localement (action paracrine ou autocrine), mais elles peuvent également agir à distance (action endocrine).

35 Parmi les médiateurs inflammatoires, on trouve des cytokines chimiotactiques, appelées chimiokines, qui sont connues pour jouer un rôle important

dans la transmigration périvasculaire et l'accumulation des leucocytes au site du dommage tissulaire.

On distingue quatre classes de chimiokines selon la distance qui existe entre les deux premiers des quatre résidus cystéine entrant dans la formation des ponts disulfures, les dites classes sont :

- les α -chimiokines (CXC), comme l'interleukine-8 (IL-8), SDF1 (*stromal cell derivated factor*), GRO (*melanoma growth-stimulating activity*) et IP-10 (*interferon- γ inducible 10 K Da protein*),

- les β -chimiokines (CC), comme RANTES (*regulated-upon-activation, normal T-cell expressed and secreted*), MIP-1 α , MIP-1 β et MIP-2 (*macrophage inflammatory proteins*) et MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 et MCP-5 (*monocyte chemotactic protein*),

- les γ -chimiokines (C), comme la lymphotactine et

- les δ -chimiokines (CX₃C), comme la neurotactine.

Ces chimiokines agissent également en se fixant sur des récepteurs qui possèdent 7 régions transmembranaires et sont liés à la protéine G.

En plus de leur rôle bien établi en tant que médiateurs de l'inflammation, on a montré récemment (P. Proost *et al.*, *Int. J. Clin. Lab. Res.* (1996), 26, 211-223) que les chimiokines avaient en fait des fonctions biologiques beaucoup plus larges, comme par exemple des propriétés de régulateur de croissance et d'angiogénèse. De même on a montré qu'elles interviennent également dans le développement des systèmes immunitaire, circulatoire et nerveux central. (R. Horuk, *Nature* (1998), 393, 524-525). Toutefois, aucune étude n'a encore montré que les chimiokines pouvaient exister dans les adipocytes et avoir un rôle important.

Or, les Inventeurs ont montré, de manière surprenante, que les chimiokines, indépendamment de leur rôle anti-inflammatoire, pouvaient jouer un rôle dans la régulation de la biologie des adipocytes.

Les adipocytes représentent les 3/4 des cellules du tissu adipeux, les autres cellules étant essentiellement des cellules précurseurs, en particulier des préadipocytes (cellules sans lipides). Le tissu adipeux joue un rôle central dans le contrôle de l'équilibre énergétique de l'organisme. Les principales fonctions sont le stockage des réserves énergétiques sous forme de triglycérides et leur mobilisation sous forme d'acides gras libres ; de plus, le développement excessif de la masse adipeuse observée au cours de l'obésité fait à la fois intervenir une hypertrophie et une hyperplasie cellulaire. Bien que le développement du tissu adipeux blanc ait lieu essentiellement en période post-natale, une augmentation de la population adipocytaire, à partir du recrutement de précurseurs cellulaires présents dans la

fraction vasculaire du stroma de ce tissu, peut aussi survenir.

Aussi, les composés qui pourraient inhiber la prolifération des préadipocytes et/ou empêcher l'accumulation des lipides dans les adipocytes et/ou modifier la production de leptine, pourraient être utiles pour la préparation de médicaments utiles dans le traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse.

En conséquence, les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir à des médicaments destinés au traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse, notamment en cas d'obésité, de cachexie, d'anorexie, de diabète et d'hyperlipidémie et au traitement des maladies associées à des troubles de la production de leptine, notamment en cas d'hypogonadisme.

La présente invention a pour objet l'utilisation des ligands des récepteurs des α -chimiokines et des β -chimiokines pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse, notamment en cas d'obésité, de cachexie, d'anorexie, de diabète et d'hyperlipidémie et au traitement des maladies associées à des troubles de la production de leptine, notamment en cas d'hypogonadisme.

Au sens de la présente invention, on entend par ligand des récepteurs de chimiokines, aussi bien les ligands naturels que les analogues synthétiques.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on utilise des ligands des récepteurs de l'IL-8.

Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, on utilise des ligands choisis dans le groupe constitué par les ligands des récepteurs de MCP-1 et MIP-1 α .

Lors de leurs travaux, les Inventeurs ont montré :

- que des cultures primaires de préadipocytes blancs humains et d'adipocytes blancs humains expriment les ARNm de certaines chimiokines et de leurs récepteurs et que cette expression peut-être régulée par le TNF α ,
- que l'expression : des ARNm de ces chimiokines, des ARNm de leurs récepteurs et des chimiokines elles-mêmes est modifiée lors de la différenciation adipocytaire,
- que le tissu adipeux brun exprime les ARNm de certaines chimiokines et de leurs récepteurs,
- que des récepteurs de chimiokines sont présents dans le tissu adipeux blanc humain et qu'un traitement par les chimiokines conduit à une diminution de la masse grasseuse,
- que ces chimiokines induisent une diminution du degré de tyrosine

phosphorylation dans les adipocytes différenciés et sont capables d'inhiber l'augmentation du degré de tyrosine phosphorylation induit par l'insuline, dans ces cellules,

- que ces chimiokines diminuent l'expression du récepteur PPAR γ et
- que MIP-1 α augmente le taux de leptine dans les cultures d'adipocytes blancs humains.

Ainsi, les préadipocytes blancs humains en culture primaire expriment les ARNm de MCP-1, IL-8 et MIP-1 α ; l'expression de l'ARNm de MCP-1 n'est pas modifiée lors de la différenciation des préadipocytes, alors que les expressions de l'ARNm de IL-8 et de MIP-1 α sont diminuées dans les adipocytes, comparativement aux préadipocytes.

Le TNF α augmente l'expression des ARNm de l'IL-8, MIP- α et de MCP-1 dans les cultures primaires d'adipocytes alors qu'il n'a pas d'effet sur l'expression des ARNm de ces chimiokines dans les préadipocytes.

Le récepteur adrénergique $\beta 3$ ($\beta 3$ AR) est spécifiquement exprimé dans les adipocytes où il intervient dans la régulation de la lipolyse et de l'adipogénèse (Strosberg A. D. *et al.* (1996) *Trends in Pharmacological Sciences* 17, 373-381). De plus une mutation naturelle de ce récepteur a été associée à une obésité morbide (Strosberg A. D. *et al.* (1997) *Trends in Pharmacological Sciences* 18, 449-454). Compte tenu de ce rôle des $\beta 3$ AR dans la régulation des fonctions des adipocytes, les Inventeurs ont recherché si l'addition d'isoprotérénol, agoniste des $\beta 3$ AR modifiait l'expression des ARNm des chimiokines elles mêmes ou celle des ARNm de leurs récepteurs. Dans ces conditions, l'expression de l'ARNm de l'IL-8 est stimulée par l'addition d'isoprotérénol dans le milieu de culture.

Le niveau d'expression de ces chimiokines au cours de la différenciation des adipocytes est corrélé à celui de leur ARNm et le niveau d'expression de MIP- α est plus faible que celui de l'IL-8 et de MCP-1.

En outre, l'expression des ARNm de certains récepteurs (CXCR1, CXCR2, CCR2, CCR5) augmente lors de la différenciation adipocytaire.

Dans ces conditions, et de manière inattendue, l'expression des récepteurs des différentes chimiokines dans les adipocytes est étroitement corrélée à la présence de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme.

L'incubation d'adipocytes blancs humains, en présence de l'IL-8, de MCP-1 et de MIP-1 α , conduit à une diminution du contenu lipidique de ces adipocytes.

L'incubation d'adipocytes humains différenciés, en présence d'IL-8, de MCP-1 et de MIP-1 α induit une diminution du degré de tyrosine phosphorylation

dans ces cellules, ainsi qu'une diminution de l'expression du récepteur PPRA γ , qui joue un rôle essentiel dans l'adipogénèse.

De plus, ces chimiokines sont capables d'inhiber l'augmentation du degré de tyrosine phosphorylation induit par l'insuline, dans les adipocytes humains différenciés.

De manière surprenante, les Inventeurs ont donc montré que les chimiokines IL-8, MCP-1 et MIP-1 α sont capables d'antagoniser les actions de l'insuline et d'inhiber l'adipogénèse.

De plus, alors que l'incubation d'adipocytes blancs humains, en présence de l'IL-8 et de MCP-1 ne modifie pas la production de leptine par les adipocytes et ce quelque soit le stade de différenciation, l'incubation d'adipocytes en présence de MIP-1 α , conduit à une augmentation de la production de la leptine.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de la capacité d'une molécule à se comporter comme un ligand vis-à-vis des récepteurs de chimiokines portés par les préadipocytes et les adipocytes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de la molécule avec des préadipocytes ou des adipocytes portant des récepteurs de chimiokines, dans des conditions qui permettent la formation d'une liaison entre au moins un récepteur des chimiokines et ladite molécule, dès lors qu'elle s'avérerait effectivement posséder une affinité pour ce récepteur, et

- la détection de la formation d'un complexe du type ligand-récepteur par des moyens physiques ou chimiques.

Cette détection peut être réalisée par tout moyen classiquement utilisé, notamment par l'utilisation de ligands radiomarqués, par immunocytochimie, par fluorescence, ou par mesure du signal transductionnel (*activated signal transduction pathways*).

Un tel procédé permet la sélection de ligands spécifiques des différents récepteurs des chimiokines exprimés dans les préadipocytes et les adipocytes, lesdits ligands agissant en outre sur la régulation des fonctions adipocytaires, en particulier sur la différenciation adipocytaire, la formation des lipides et la production de leptine.

La présente invention a également pour objet un procédé pour l'étude des récepteurs des chimiokines exprimés par les préadipocytes et les adipocytes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de ligands déterminés avec des préadipocytes ou des adipocytes, et

- la détection de la formation d'un complexe du type ligand-récepteur par des moyens physiques ou chimiques.

Cette détection peut être réalisée par tout moyen classiquement utilisé, notamment par l'utilisation de ligand radiomarké, par immunocytochimie, par fluorescence, ou par mesure du signal transductionnel (*activated signal transduction pathways*).

Un tel procédé permet d'étudier la pharmacologie des récepteurs de chimiokines impliqués dans la régulation des fonctions adipocytaires, en particulier dans la différenciation adipocytaire, la formation des lipides et la production de leptine, d'identifier des ligands ayant une meilleure affinité pour ces récepteurs et de mettre au point des médicaments actifs dans le traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse, notamment en cas d'obésité, de cachexie, d'anorexie, de diabète et d'hyperlipidémie.

La présente invention a également pour objet un procédé pour l'étude de la capacité d'un ligand des récepteurs des chimiokines exprimés par les adipocytes, à modifier l'accumulation des lipides dans lesdits adipocytes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact du ligand à étudier avec des adipocytes et
- la détection de la formation des lipides dans lesdits adipocytes, par des moyens physiques ou chimiques.

Cette détection peut être réalisée par tout moyen classiquement utilisé, notamment par marquage au *Oil Red O* selon la méthode décrite par Ramirez-Zacarias J.L. *et al.* (1992), *Histochemistry*, 97, 493-497).

Un tel procédé permet de sélectionner des ligands spécifiques des différents récepteurs des chimiokines exprimés dans les adipocytes, lesdits ligands agissant sur la formation des lipides dans lesdits adipocytes et de mettre au point des médicaments actifs dans le traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse, notamment en cas d'obésité, de cachexie, d'anorexie, de diabète et d'hyperlipidémie, et actifs dans le traitement des maladies associées à des troubles de la production de la leptine, notamment en cas d'hypogonadisme

La présente invention a également pour objet un procédé pour l'étude de la capacité d'un ligand des récepteurs des chimiokines exprimés par les adipocytes, à modifier la production de leptine par lesdits adipocytes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact du ligand à étudier avec des adipocytes et
- la détection de la production de leptine par des moyens physiques ou chimiques.

Cette détection peut être réalisée par tout moyen classiquement utilisé, notamment par une méthode radioimmunologique [RIA (*Radio-Immuno-Assay*)].

Un tel procédé permet de sélectionner des ligands spécifiques des différents récepteurs des chimiokines exprimés dans les adipocytes, lesdits ligands agissant sur la production de leptine par lesdits adipocytes et de mettre au point des médicaments actifs dans le traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse, notamment en cas d'obésité, de cachexie, d'anorexie, de diabète et d'hyperlipidémie, et actifs dans le traitement des maladies associées à des troubles de la production de la leptine, notamment en cas d'hypogonadisme.

Selon l'invention, pour la mise en œuvre desdits procédés, on utilise des préadipocytes et des adipocytes issus du tissu adipeux blanc ou brun, humain ou murin ou des lignées cellulaires de préadipocytes, comme par exemple les lignées cellulaires de préadipocytes blancs de souris 3T3-L1 [Green H. *et al.* (1974), *Cell*, 1, 113-116; souche ATCC CCL-92.1, *mouse embryo, substrain of 3T3* déposée à l'American Type Culture Collection (ATCC)] et 3T3-F442A [Green H. *et al.* (1976), *Cell*, 7, 105-113] et les lignées cellulaires de préadipocytes bruns humains PAZ-6 [Zilberfarb V. *et al.* (1997), *J. Cell Sc.*, 110, 801-807; souche I-1531 déposée à Collection Nationale de Cultures et de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur].

De préférence, on utilise des préadipocytes et des adipocytes issus du tissu adipeux blanc humain.

La présente invention a, en outre, pour objet une trousse de détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour les récepteurs des chimiokines exprimées par les préadipocytes et les adipocytes, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des préadipocytes ou des adipocytes en culture,
- un ou plusieurs ligands témoins et
- des moyens de détection du complexe ligand-récepteur.

La présente invention a, en outre, pour objet une trousse de détection de la capacité d'un ligand des récepteurs des chimiokines exprimées par les adipocytes, à modifier la formation des lipides dans lesdits adipocytes, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des adipocytes en culture, et
- des moyens pour détecter les lipides formés dans lesdits adipocytes.

La présente invention a, en outre, pour objet une trousse de détection de la capacité d'un ligand des récepteurs des chimiokines exprimés par les adipocytes,

à modifier la production de leptine par lesdits adipocytes, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des adipocytes en culture, et
- des moyens pour détecter la leptine produite par lesdits adipocytes.

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples illustrés par les figures dans lesquelles :

- la figure 1 illustre l'expression des ARNm des chimiokines dans les préadipocytes et les adipocytes blancs humains ; la détection est réalisée par RT-PCR selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1. Les préadipocytes et les adipocytes
10 blancs humains sont cultivés en l'absence (-) ou en présence (+) d'isoproténéról 1 μ M pendant 18 heures ; MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*) ; MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*).

- la figure 2 illustre l'expression des ARNm des récepteurs de chimiokines dans les préadipocytes et les adipocytes blancs humains ; la détection est
15 réalisée par RT-PCR selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1. Les préadipocytes et les adipocytes blancs humains sont cultivés en l'absence (-) ou en présence (+) d'isoproténéról 1 μ M pendant 18 heures ; IL-8 (interleukine 8), MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*), MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*).

- la figure 3 représente l'expression des récepteurs de chimiokines
20 dans les adipocytes blancs humains détectée par immunocytochimie selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1 ; CXCR1 et CXCR2 sont des récepteurs de IL-8 (interleukine 8), CCR2 est le récepteur de MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*) et CCR5 est le récepteur de MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*)

- la figure 4 représente l'effet des chimiokines sur l'accumulation des
25 lipides dans les adipocytes blancs primaires humains. Les adipocytes blancs humains sont cultivés soit en l'absence de chimiokines, soit en présence de IL-8 (interleukine 8), de MCP-1 (*monocyte chemotactin protein*) ou de MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*) à 50 nM ; la formation des lipides est mesurée après 12 jours de culture. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm erreur standard à la
30 moyenne (s.e.m.) de 5 ou 6 expériences.

- la figure 5 représente l'effet des chimiokines sur la production de leptine par des adipocytes blancs primaires humains. Les adipocytes blancs humains sont cultivés soit en l'absence de chimiokines (-■-), soit en présence de IL-8 (-■- interleukine 8) à 100 nM, ou de MCP-1 (-■- *monocyte chemotactin protein*) à 100 nM
35 ou de MIP-1 α (-■- *macrophage inflammatory protein 1 α*) à 100 nM ; la production de leptine est mesurée après 4, 8 et 12 jours de culture. Les résultats sont exprimés

comme la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (s.e.m.) d'une expérience réalisée en triplicata.

EXEMPLE 1 : Matériel et méthodes mis en oeuvre pour étudier l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs dans les préadipocytes et les adipocytes blancs humains.

1. Cultures cellulaires :

a) préadipocytes : le tissu adipeux omental est obtenu de sujets sains ayant subi une chirurgie esthétique. Le tissu est coupé en petits morceaux et digéré pendant 1 heure à 37°C par de la collagénase de type 2 (Worthington) à une concentration de 1 mg/ml. Après digestion, le tissu est filtré sur un filtre de nylon, et les préadipocytes sont isolés par centrifugation à 200 g pendant 10 minutes. Le culot, qui contient les préadipocytes, est traité par un tampon contenant : NH_4Cl 154 mM, KHCO_3 10 mM et EDTA 0,1 mM afin d'éliminer les globules rouges.

b) adipocytes : les préadipocytes obtenus sont mis en culture jusqu'à confluence dans un mélange (1:1) de Ham's F12/DMEM (*Dubelcco's modified Eagles medium* ; Gibco-BRL) supplémenté avec du tampon Hepes 20 mM (Gibco-BRL), 5 % de sérum de veau foetal décomplémenté (Gibco-BRL) et des antibiotiques. Lorsque les cellules ont atteint la confluence, elles sont transférées dans un milieu supplémenté avec de la biotine (33 μM , Sigma), du panthoténate (18 μM , Sigma), de la triiodothyronine (T3, 1 nM, Sigma), de l'insuline (85 nM, Sigma), de la dexaméthasone (1 μM , Sigma), de la 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine (250 nM, Sigma) et de la naphthiazol (1 μM , agoniste de PPR- γ , don du Dr. J. Duhault, IRIS France). Les cellules sont maintenues dans ce milieu pendant 12 jours en changeant le milieu tous les 3 jours.

2. Marquage au Oil Red O. et quantification des lipides dans les cellules adipocytes :

La solution de *Oil Red O.* est préparée selon la méthode décrite par Ramirez-Zacarias J.L. *et al.* (1992), *Histochemistry*, 97, 493-497. Six plaques multi-puits sont lavées 2 fois par du tampon PBS salin (*phosphate buffered saline*), fixées pendant 1 heure par une solution de formaline à 10 % dans le PBS, lavées avec de l'eau, marquées pendant 2 heures par immersion complète dans une solution de *Oil Red O.* et rincées deux fois avec de l'eau. L'excès d'eau est évaporé en plaçant les plaques à 37 °C. Le colorant est extrait par 200 μl d'alcool isopropylique par puits et l'absorbance d'un aliquot est mesurée immédiatement à 492 nm.

Les lipides (triglycérides) sont quantifiés en utilisant des courbes de calibration de trioléine (Sigma) selon la méthode décrite par Ramirez-Zacarias J.L.

(Ramirez-Zacarias J.L. *et al.* (1992), déjà cité).

3. RT-PCR :

L'ARN total est extrait des adipocytes blancs primaires humains (passage 1-3) en utilisant l'agent d'isolement Trizol RNA (Gibco Life Sciences).

5 20 µg d'ARN total sont traités par 6 U d'ADNase I sans ARNase (RQ1 DNase Promega) dans un milieu contenant du Tris-HCl 40 mM, à pH 9, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, en présence de 2 U/µl d'inhibiteur d'ARNase (RNaseOUT, Gibco Life Sciences).

10 L'ARN est ensuite extrait par un mélange de phénol et de chloroforme, précipité par de l'éthanol, séché et suspendu dans l'eau.

L'ADNc est préparé à partir de 2 µg d'ARN total sans ADN en utilisant la transcriptase inverse du Virus de Moloney de la leucémie murine (SuperScript™ II, Gibco Life Sciences) selon les instructions du fabricant.

15 Des témoins sans transcriptase inverse sont préparés afin d'exclure toute possibilité de contamination par l'ADN.

100 ng d'ARN ainsi transcrits sont amplifiés par 1 U de Taq polymérase (Gibco Life Sciences) dans un volume final de 30 µl de tampon contenant : Tris-HCl 20 mM, à pH 8,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 250 µM et 250 µM de séquences amorces sens et antisens spécifique d'un gène dans un thermocycleur (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus).

20 Les produits d'amplification sont visualisés après électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % par du BET (*ethidium bromide*).

Pour la détermination semi-quantitative des RT-PCRs, on réalise l'analyse pendant la phase exponentielle de l'amplification.

25 Les séquences amorces sens et antisens sont les suivantes :

- cyclophiline : SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 ;
- interleukine-8 : SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4 ;
- MIP-1α : SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6 ;
- MCP-1 : SEQ ID N° 7 et SEQ ID N° 8 ;
- 30 - CXCR1 : SEQ ID N° 9 et SEQ ID N° 10 ;
- CXCR2 : SEQ ID N° 11 et SEQ ID N° 12 ;
- CCR1 : SEQ ID N° 13 et SEQ ID N° 14 ;
- CCR2 : SEQ ID N° 15 et SEQ ID N° 16 ;
- CCR4 : SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 18 ;
- 35 - CCR5 : SEQ ID N° 19 et SEQ ID N° 20 ;
- CCR9/10 : SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22 ;

4. Caractérisation de l'expression des ARNm des récepteurs par immunocytochimie :

Les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde à 4 % pendant 15 minutes, traitées (*quenching*) par une solution de glycine 0,1 M dans du PBS (*phosphate buffer saline*) et perméabilisées par du PBS contenant 0,2 % de BSA (*bovine serum albumin*) et 0,05 % de saponine. Après plusieurs lavages, les cellules sont traitées par du PBS contenant 10 % de FCS (*fetal calf serum*).

Ensuite les cellules sont incubées pendant une nuit, soit avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR2 et CCR5 (dilution 1 :100, R&D), soit avec des anticorps polyclonaux dirigés contre CCR4 (dilution 1 :100, Santa Cruz).

Finalement les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire conjugué avec un chromophore (isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou Cy3) dans le même tampon pendant 1 heure, puis lavées abondamment avant d'être montées.

Les témoins sont préparés en omettant les anticorps primaires et en les remplaçant par des anticorps monoclonaux du même isotype.

Après montage les cellules sont examinées au microscope à laser (MRC 1000 Biorad, Hercules, CA, USA).

5. Mesure de la production de leptine par les adipocytes

La leptine est mesurée dans le milieu de culture, par une méthode radioimmunologique, selon la technique décrite par Ma Z. *et al.*, (1996), *Clinical chemistry*, 42, 942-946), à l'aide du kit de chez Linco Research Inc. (St Charles, MO, USA) en suivant les instructions du fabricant.

La limite de détection de la méthode est de 0,5 ng/ml.

EXEMPLE 2 : Expression des ARNm des chimiokines dans les préadipocytes et les adipocytes blancs humains.

Le mode opératoire est celui décrit dans l'exemple 1.

Les résultats sont illustrés à la figure 1.

La cyclophiline est utilisée comme témoin de l'expression des ARNm totaux.

L'expression de MCP-1 n'est pas modifiée pendant la différenciation adipocytaire alors que l'expression de l'IL-8 et de MIP-1 α est diminuée dans les adipocytes comparativement aux préadipocytes.

L'isoprotérénol stimule l'expression de l'IL-8 dans les adipocytes mais est sans effet sur celle de l'IL-8 dans les préadipocytes.

L'isoprotérénol est sans effet sur l'expression de MIP-1 α et de

MCP-1, aussi bien dans les préadipocytes que dans les adipocytes.

EXEMPLE 3 : Expression des ARNm des récepteurs des chimiokines dans les adipocytes blancs humains.

5 Le mode opératoire est celui décrit dans l'exemple 1.

1. dans les préadipocytes : les résultats sont illustrés dans la figure 2 et dans le tableau I ci-après.

Les récepteurs CXCR1 et CCR2 ne sont pas exprimés dans les préadipocytes blancs humains.

10 Les récepteurs CXCR2, CCR4 et CCR5 sont faiblement exprimés dans les préadipocytes blancs humains.

Les récepteurs CCR1 et CCR9/10 sont fortement exprimés dans les préadipocytes blancs humains.

15 L'isoproténéról stimule l'expression des récepteurs CXCR1, CXCR2, CCR2 et CCR5 dans les préadipocytes blancs humains, mais est sans effet sur l'expression des autres récepteurs.

2. dans les adipocytes : les résultats sont illustrés dans les figures 2 et 3 et dans le tableau I ci-après.

20 Tous les récepteurs CXCR1, CXCR2, CCR1, CCR2, CCR4, CCR5 et CCR10 sont fortement exprimés dans les adipocytes blancs humains.

L'isoproténéról est sans effet sur l'expression des différents récepteurs de chimiokines dans les adipocytes blancs humains.

25 L'expression des récepteurs CXCR1, CXCR2 et CCR5 est limitée aux adipocytes complètement différenciés puisqu'elle est liée à la présence de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme (figure 3).

L'expression des récepteurs CCR2, en revanche, apparaît dans les cellules sans gouttelettes lipidiques mais seulement après mise en culture dans le milieu de différenciation.

30 L'expression du récepteur multifonctionnel CXCR4, récepteur de SDF-1 α (*stromal cell derivated factor*), est également limitée aux adipocytes complètement différenciés puisqu'elle est liée à la présence de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme (tableau 1).

TABLEAU I

RECEPTEURS	LIGANDS	PREADIPOCYTES	ADIPOCYTES
CXCR1	IL-8, CGP-2	-	++
CXCR2	IL-8, NAP-2,	+	++
	GRO α , ENA-78		
CXCR4	SDF-1 α	+	++
CCR1	MIP-1 α , RANTES	+	+
	MCP-3		
CCR2	MCP-1,2,3,4,5	-	++
CCR4	MIP-1 α , RANTES	+	++
	TARC, MDC		
CCR5	MIP-1 α , β , RANTES	+	++
CCR10	MCP-1,3	++	++

EXEMPLE 4 : Effet des chimiokines sur la formation de lipides dans les adipocytes.

Les lipides sont mesurés selon la technique décrite dans l'exemple 1.
Les résultats sont illustrés à la figure 4.

IL-8 diminue de manière significative la formation des lipides dans les adipocytes après 12 jours de culture ; l'inhibition est en moyenne de 22 % \pm 6, avec un taux d'inhibition maximale de 41 %.

MIP-1 α diminue la formation des lipides dans les adipocytes après 12 jours de culture ; l'inhibition est en moyenne de 21 % \pm 9, avec un taux d'inhibition maximale de 47 %.

MCP-1 diminue également de manière significative la formation des lipides dans les adipocytes après 12 jours de culture ; l'inhibition est en moyenne de 23 % \pm 7, avec un taux d'inhibition maximale de 47 %.

Cet effet inhibiteur apparaît dès la concentration de 10 nM.

De plus la diminution du taux de lipides induite par les chimiokines est liée à l'état de maturation des adipocytes ; en effet dans des cultures qui contiennent de nombreuses cellules avec des grandes vacuoles lipidiques les chimiokines induisent une diminution allant jusqu'à 59 % pour IL-8, 52% pour MIP-1 α et 53 % pour MCP-1.

EXEMPLE 5 : Production de leptine par des adipocytes blancs primaires différenciés *in vitro*

La leptine est mesurée selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1.

Les résultats sont donnés à la figure 5.

La production de leptine par les adipocytes augmente lors de la différenciation et cet effet n'est pas modifié par l'addition de IL-8 ou de MCP-1 dans le milieu de culture, quelque soit le stade de différenciation.

5 En revanche l'addition de MIP-1 α augmente d'environ 50 % et ce de manière significative, les taux de leptine, à tous les stades de différenciation.

Ces résultats suggèrent que les chimiokines pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la biologie des adipocytes et que les agonistes et les antagonistes des récepteurs de chimiokines pourraient être utiles pour la préparation de
10 médicaments utiles pour le traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse, notamment en cas d'obésité, de cachexie, d'anorexie, de diabète et d'hyperlipidémie et au traitement des maladies associées à des troubles de la production de leptine, notamment en cas d'hypogonadisme.

REVENDICATIONS

1) Utilisation des agonistes et des antagonistes des récepteurs de chimiokines pour la préparation de médicaments utiles dans le traitement des troubles de la régulation de la masse adipeuse et dans le traitement des maladies associées aux troubles de la production de leptine.

2) Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que les agonistes et les antagonistes sont choisis dans le groupe constitué par les agonistes et les antagonistes des récepteurs CXCR des α -chimiokines.

3) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'on utilise des agonistes et des antagonistes des récepteurs de l'IL-8.

4) Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que les agonistes et les antagonistes sont choisis dans le groupe constitué par les agonistes et les antagonistes des récepteurs CCR des β -chimiokines.

5) Utilisation selon la revendication 4 caractérisée en ce que l'on utilise des agonistes et des antagonistes choisis dans le groupe constitué par les agonistes et les antagonistes des récepteurs de MIP-1 α ou MCP-1.

6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le trouble de la régulation de la masse adipeuse est choisi dans le groupe constitué par l'obésité, la cachexie, l'anorexie, le diabète et l'hyperlipidémie et la maladie associée aux troubles de la production de leptine est l'hypogonadisme.

7) Procédé de détection de la capacité d'une molécule à se comporter comme un ligand vis-à-vis des récepteurs de chimiokines, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de la molécule avec des préadipocytes ou des adipocytes portant des récepteurs de chimiokines, dans des conditions qui permettent la formation d'une liaison entre au moins un récepteur des chimiokines et ladite molécule, dès lors qu'elle s'avèrerait effectivement posséder une affinité pour ce récepteur, et

- la détection de la formation d'un complexe du type ligand-récepteur par des moyens physiques ou chimiques.

8) Procédé pour l'étude des récepteurs des chimiokines exprimés par les préadipocytes et les adipocytes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de ligands déterminés avec des préadipocytes ou des adipocytes, et

- la détection de la formation d'un complexe du type ligand-récepteur par des moyens physiques ou chimiques.

9) Procédé pour l'étude de la capacité d'un ligand des récepteurs des chimiokines exprimés par les adipocytes, à modifier l'accumulation des lipides dans lesdits adipocytes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact du ligand à étudier avec des adipocytes et
- la détection de la formation des lipides dans lesdits adipocytes, par des moyens physiques ou chimiques.

10) Procédé pour l'étude de la capacité d'un ligand des récepteurs des chimiokines exprimés par les adipocytes, à modifier la production de leptine par lesdits adipocytes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact du ligand à étudier avec des adipocytes et
- la détection de la production de leptine par des moyens physiques ou chimiques.

11) Procédé selon l'une quelconque des revendication 7 à 10, caractérisé en ce que les préadipocytes et les adipocytes sont issus du tissu adipeux blanc humain.

12) Trousse de détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour les récepteurs des chimiokines exprimées par les préadipocytes et les adipocytes, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des préadipocytes ou des adipocytes en culture,
- un ou plusieurs ligands témoins et
- des moyens appropriés pour la détection du complexe ligand-récepteur.

13) Trousse de détection de la capacité d'un ligand des récepteurs des chimiokines exprimées par les adipocytes, à modifier la formation des lipides dans lesdits adipocytes, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des adipocytes en culture, et
- des moyens pour détecter les lipides formés dans lesdits adipocytes.

14) Trousse de détection de la capacité d'un ligand des récepteurs des chimiokines exprimés par les adipocytes, à modifier la production de leptine par lesdits adipocytes, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des adipocytes en culture, et
- des moyens pour détecter la leptine produite par lesdits adipocytes.

1/5

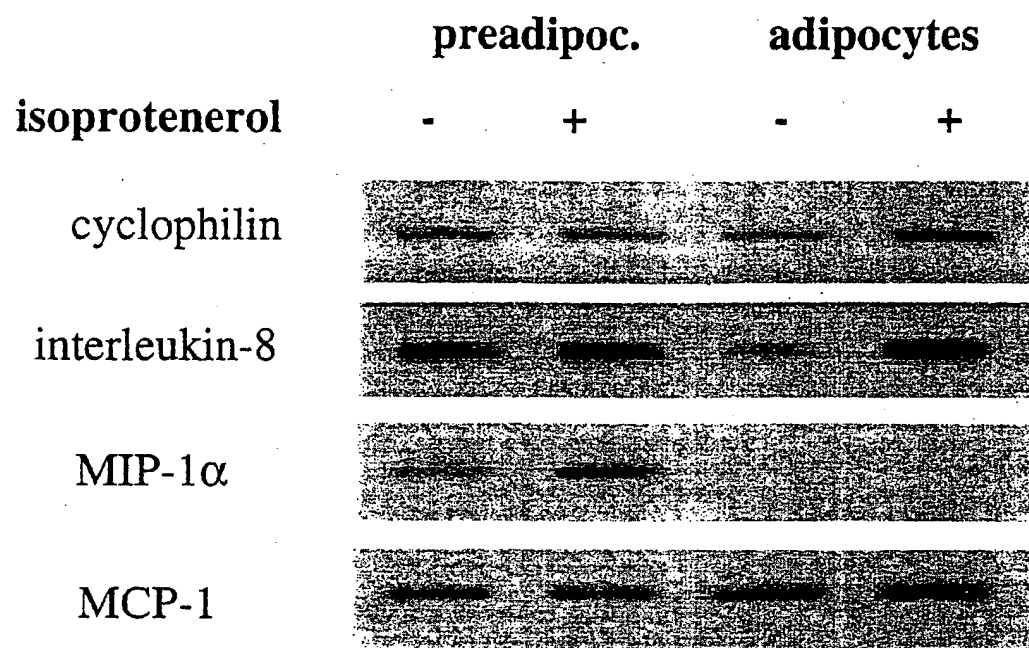


FIGURE 1

2/5

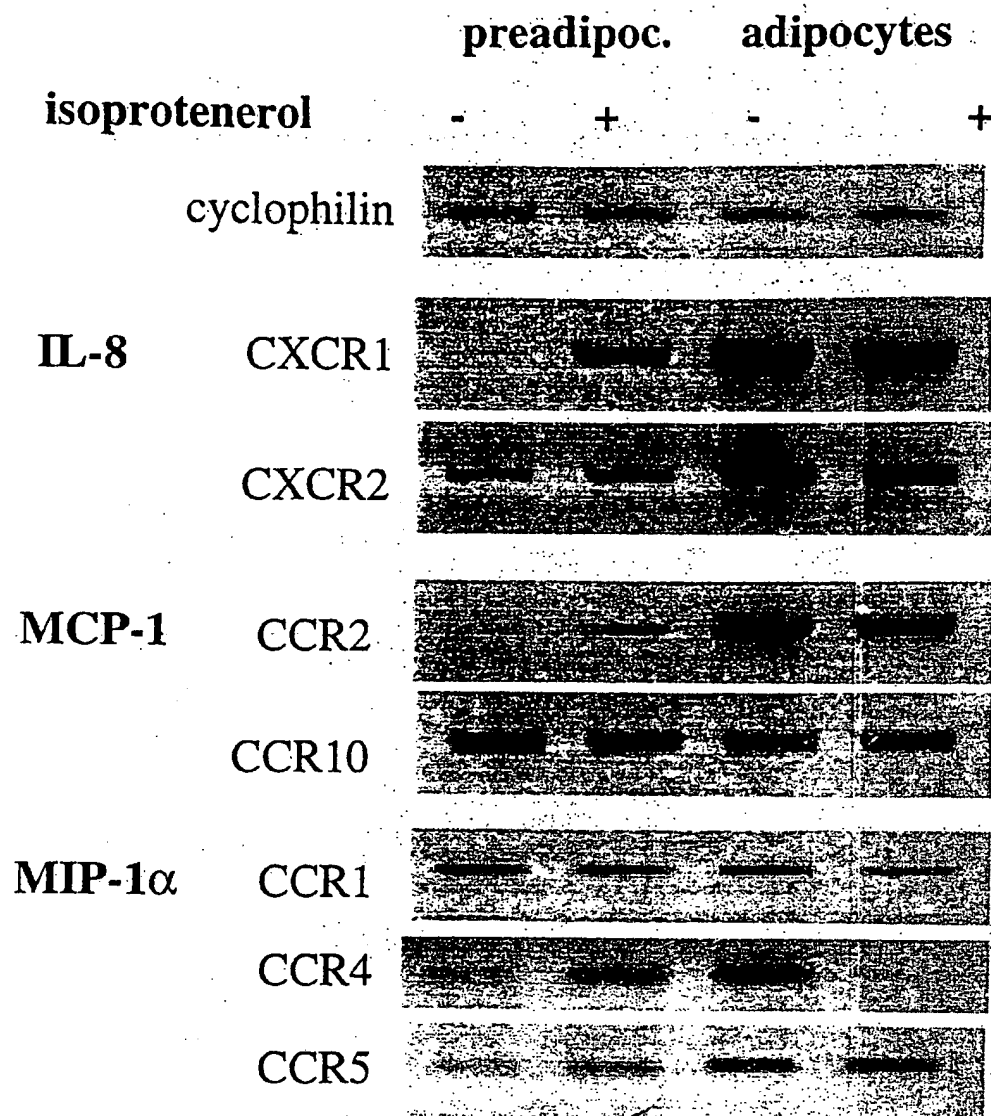
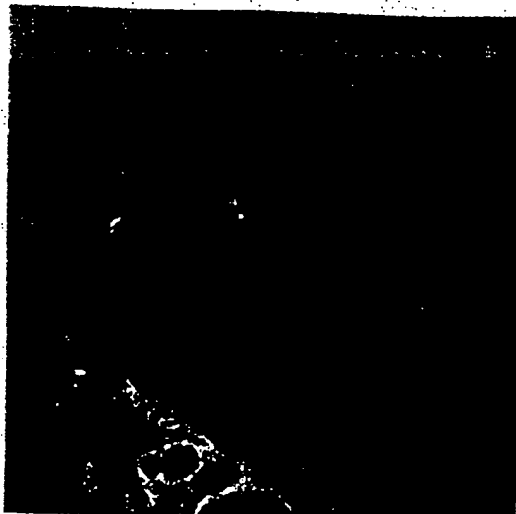
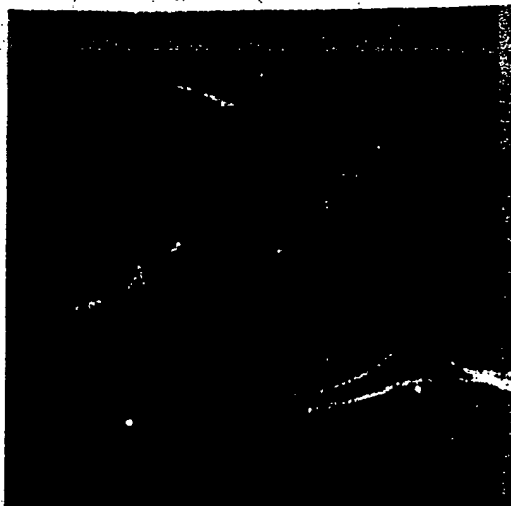


FIGURE 2

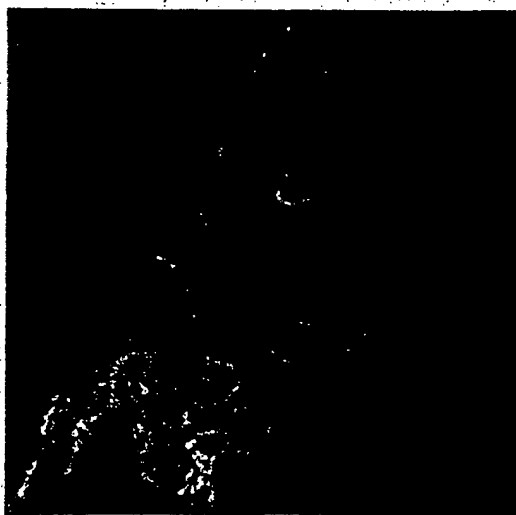
3/5



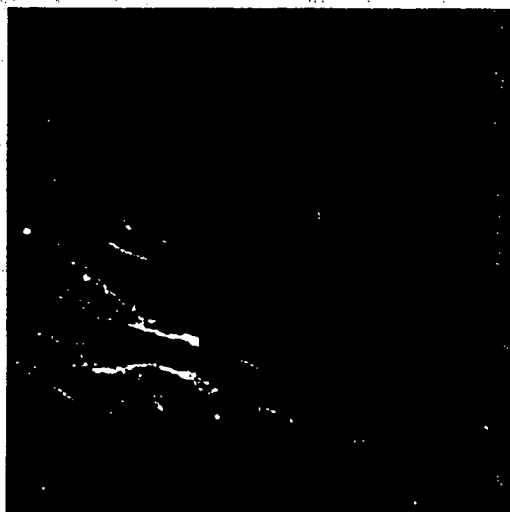
CXCR2



CCR5



CXCR1



CCR2

FIGURE 3

Chimiokine (50 nM)	% inhibition (moyen)	% inhibition (maximal)
IL8	22±6 (n=6)	41
MCP1	21±9 (n=5)	47
MIP1α	23±7 (n=5)	47

FIGURE 4

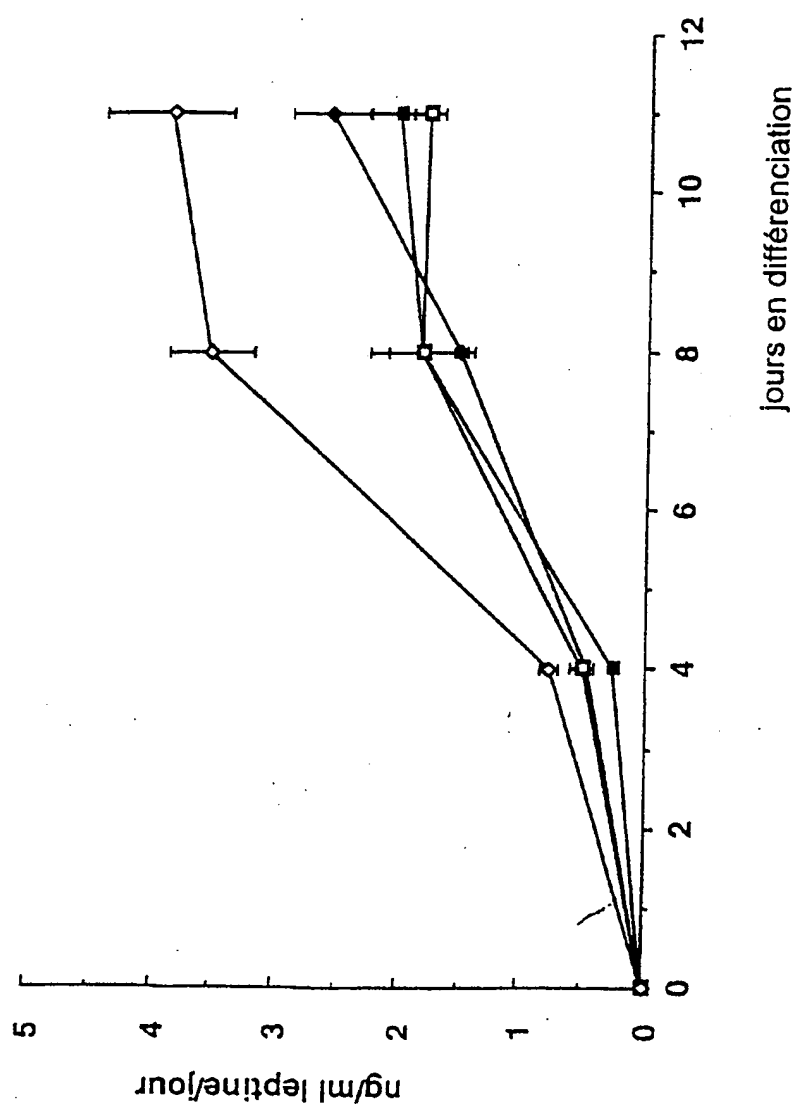


FIGURE 5

LISTE DE SEQUENCES

- <110> CENTRE NATIONAL DE LARECHERCHE SCIENTIFIQUE
GERHHARDT, Cinderella
ROMERO-ROMERO, Ignacio-Andrès
STROSBURG, Donny A.
- <120> MEDICAMENTS UTILES POUR LE TRAITEMENT DES TROUBLES DE
LA REGULATION DE LA MASSE ADIPEUSE ET LES MALADIES
ASSOCIEES AUX TROUBLES DE LA PRODUCTION DE LEPTINE
- <130> 644FR42
- <140>
<141>
- <160> 22
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
- <220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE
- <400> 1
agcactggag agaaaggatt 20
- <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
- <220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE
- <400> 2
ggaggaaca agaaaacat 20
- <210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
- <220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE
- <400> 3
ttggcagcct tcttgatt 18
- <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 4

aacttctcca caaccctctg

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 5

gtcatcttcc taaccaagcg

20

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 6

tgtggctgtt tggcaacaac

20

<210> 7

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 7

caatcaatgc cccagtcac

19

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 8

gattcttggg ttgtgggagt g

21

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 9

ccattgctga aactgaagag g

21

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 10

ttgtttggat ggtaagcctg g

21

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 11

cgaaggaccg tctactcatc

20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 12

agtgtgccct gaagaagagc

20

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 13

acgaaagcct acgagagtg

19

<210> 14

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 14
ggtgaacagg aagtcttgg

19

<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 15
gattacgggtg ctccctgtc

19

<210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 16
gccacagaca taaacagaat c

21

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 17
agcacttggt atactgagcg

20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 18
ccaccacggc aaagatcatc

20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 19
gacaaactct cccttcactc

20

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 20
acaagtctct cgcttggttc

20

<210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<400> 21
agagcctgct ccttgctac

19

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<300>

<400> 22
agcctcacca agacacaac

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/01171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/19 A61P3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, LIFESCIENCES, SCISEARCH, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STROSBURG A D: "Towards the development and use of human-selective agonists for the pharmacologic treatment of obesity and diabetes." JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, (1997 NOV) 155 (2) 221-2., XP000876987 the whole document	1-14
A	MANTZOROS C S ET AL: "Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans." JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, (1997 OCT) 82 (10) 3408-13., XP000877171 the whole document	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 2000

Date of mailing of the international search report

06/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01171

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZILBERFARB V ET AL: "Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis" JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 110, no. 7, April 1997 (1997-04), pages 801-807, XP002117551 the whole document	1-14
A	----- GALITZKY J ET AL: "On the presence of a putative fourth beta-adrenoceptor in human adipose tissue" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, vol. 19, no. 5, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 164-165, XP004121091 ISSN: 0165-6147 the whole document	1-14
A	----- EP 0 897 980 A (SMITHKLINE BEECHAM) 24 February 1999 (1999-02-24) the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01171

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 897980 A	24-02-1999	CA 2241429 A JP 2000083669 A	20-02-1999 28-03-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des. internationale No
PCT/FR 00/01171

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K38/19 A61P3/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, LIFESCIENCES, SCISEARCH, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	STROSBERG A D: "Towards the development and use of human-selective agonists for the pharmacologic treatment of obesity and diabetes." JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, (1997 NOV) 155 (2) 221-2., XP000876987 le document en entier	1-14
A	MANTZOROS C S ET AL: "Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans." JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, (1997 OCT) 82 (10) 3408-13., XP000877171 le document en entier	1-14
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 29 septembre 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 06/10/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Fonctionnaire autorisé Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donnée internationale No

PCT/FR 00/01171

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ZILBERFARB V ET AL: "Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis" JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 110, no. 7, avril 1997 (1997-04), pages 801-807, XP002117551 le document en entier ---	1-14
A	GALITZKY J ET AL: "On the presence of a putative fourth beta-adrenoceptor in human adipose tissue" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, vol. 19, no. 5, 1 mai 1998 (1998-05-01), pages 164-165, XP004121091 ISSN: 0165-6147 le document en entier ---	1-14
A	EP 0 897 980 A (SMITHKLINE BEECHAM) 24 février 1999 (1999-02-24) le document en entier ---	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Donnée internationale No

PCT/FR 00/01171

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 897980 A	24-02-1999	CA 2241429 A JP 2000083669 A	20-02-1999 28-03-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)